

Nancy 1969

La formation des somites chez l'embryon d'oiseau: étude expérimentale

Par R. LANOT¹

Laboratoire de Zoologie, Université de Nancy

SUMMARY

Somitogenesis in the avian embryo: an experimental study

The determinism of somitogenesis has been studied.

A complete segmental plate can form somites even when isolated from cord, neural tube and somites. Somites are always formed if the segmental plate remains in continuity with the somites which have just formed.

When the segmental plate is separated from the axis and deprived of its apical end, it undergoes no differentiation or differentiates incompletely. In the latter case the quality of differentiation decreases in a cephalo-caudal direction.

When the segmental plate, without its apical end, is left in contact with neural tissue or chorda, it forms somites normally.

The growth of the segmental plate is reduced whenever it has been isolated from neural tube and chorda altogether.

Behind its apical end the segmental plate can regulate excesses as well as deficiencies.

It appears, then, that the intersomitic fissures are determined at the apical ends of the segmental plates, but not behind them.

This determination is progressively established backwards. It can be transmitted by the last differentiated as well as the differentiating somites. However, the neural tube, and possibly the cord, play the leading role in this process, for the intersomitic clefts are fixed at their proper place in connexion with them.

INTRODUCTION

Dans l'embryon d'oiseau, l'ébauche somitique est déterminée très tôt en tant que telle (Gallera, 1966).

Au moment de la formation de l'embryon, c'est la région nodale qui confère sa détermination à l'ébauche présomptive des somites (Nicolet, 1968). Cependant à des stades plus tardifs (Spratt, 1955, fig. 6a; Menkes & Miclea, 1962) le matériel somitique non segmenté semble capable de régulation. Par ailleurs, il est possible de perturber, voire de supprimer, la formation des somites à partir des lames segmentaires par l'action d'agents chimiques (Herrmann, 1953; Herrmann, Konigsberg & Curry, 1955; Rothfels, 1954; Stéphan & Sutter, 1960; Mulherkar, 1960). La différenciation du mésenchyme en muscle et en cartilage n'est pas pour autant supprimée (Charrault, 1961).

¹ Adresse de l'auteur : Laboratoire de Zoologie, 30, rue Sainte-Catherine 54-Nancy, France.

Une étape précoce de la différenciation de l'ébauche peut donc être inhibée et, s'il s'agit d'un somite postérieur, à un stade relativement tardif de l'embryogénèse.

On peut donc s'interroger sur l'état de détermination de l'ébauche somitique même après sa mise en place. La formation des somites étant un phénomène d'une grande régularité, l'existence d'un mécanisme de contrôle semble probable.

Dans le présent article, nous examinerons successivement les questions suivantes.

- (1) Quel est l'état de détermination de l'ébauche somitique mise en place ?
- (2) Le matériel des lames segmentaires est-il capable de régulation ?
- (3) Les structures voisines exercent-elles une influence sur la différenciation des lames segmentaires ?

MATERIEL ET METHODES

Les diverses opérations, qui seront décrites plus loin, ont été effectuées soit en culture *in vitro* sans coloration de l'embryon, soit dans l'œuf après coloration au rouge neutre ou bien après injection sous le blastoderme d'une suspension de noir animal dans la gélose (Sandor, 1968).

Les exérèses et les sections ont été pratiquées à l'aide de fines aiguilles de tungstène fabriquées à partir de filaments d'ampoules électriques de 100 à 200 W. Le filament monté dans une pipette Pasteur est étiré dans la flamme de la veilleuse d'un bec Bunsen. L'aiguisage se fait en plongeant et en retirant le filament dans la flamme. On peut, de la sorte, obtenir des pointes extrêmement fines, qui peuvent être nettoyées et stérilisées à la flamme. Ces aiguilles permettent d'opérer des embryons jusqu'à la 48ème h d'incubation.

Les embryons ont été fixés après un temps d'incubation d'au moins 5 h pour les embryons opérés dans l'œuf, ou 12 h pour ceux qui ont été cultivés *in vitro*. Les embryons furent ensuite colorés par le mélange bleu de toluidine-éosine (solution aqueuse contenant 1 % de bleu de toluidine et 2 % d'éosine). Le mélange colorant utilisé agit rapidement en 5 à 15 min, selon la taille, l'âge des embryons et l'effet recherché. L'adjonction d'éosine permet une différenciation plus nette de la coloration. Cette différenciation se fait à l'alcool à 90°. Les embryons sont ensuite montés *in toto* pour être observés. Pour que la coloration se conserve, il faut que les embryons soient parfaitement deshydratés. Certains de ces embryons ainsi préparés ont été repris, débités en coupes sérieées, de 5 μ m d'épaisseur et recolorés à l'hémalum-éosine. Dans les résultats qui vont être exposés, il n'a pas été tenu compte des embryons qui présentaient une inhibition des mouvements morphogénétiques ou une dégénérescence de leur extrémité postérieure, sauf lorsqu'ils ont formé de nouveaux somites d'allure normale, malgré cette dégénérescence.

RESULTATS

I. *Etat de détermination des lames segmentaires*A. *Etat de détermination globale*

Le degré de détermination des lames segmentaires peut être évalué en observant la différenciation de cette ébauche lorsqu'elle est isolée.

Des expériences préliminaires ont été faites en culture *in vitro* ou en greffes blastodermiques selon la technique de Gallera (1966) à partir d'embryons de 10 à 20 paires de somites. Elles n'ont pas donné de résultats utilisables: dans les deux cas les lames segmentaires isolées ne se différencient pas normalement.

Tableau 1. *Evolution de la lame segmentaire séparée de la corde et du tube neural*

Opération	Nombre total	Segmentation normale	Retard de la segmentation	Irrégularités de la segmentation	Absence de segmentation
Incision longitudinale	10	4	1	1	4
Exérèse des organes axiaux	6	6	0	0	0

L'isolement de la lame segmentaire peut cependant être obtenu soit en la séparant des organes axiaux soit en supprimant ceux-ci. Dans le premier cas, la lame segmentaire est séparée de l'axe embryonnaire par une incision longitudinale, passant à ras du tube neural et qui intéresse aussi bien l'endoderme que l'ectoderme. Aux stades précoces (4 à 7 somites), l'opération est complétée par l'exérèse d'une moitié du sinus rhomboïdal. Il se forme un trou dans le blastoderme. Cependant, au bord externe de la plaie, l'ectoderme recouvre rapidement le mésenchyme mis à nu et rejoint l'endoderme. Dix embryons de 4 à 22 paires de somites ont été opérés de cette façon (Fig. 8A). Dans le second cas, les organes axiaux: corde, tube neural et endoderme ont été supprimés au niveau de la moitié antérieure des lames segmentaires chez 6 embryons de 15 à 20 paires de somites (Fig. 1). Le Tableau 1 résume les résultats.

Dans le premier type d'expérience le stade des embryons au moment de l'opération ne semble pas avoir d'influence sur le résultat. On observe, par exemple, que chez un embryon opéré au stade de 4 paires de somites, la lame segmentaire isolée s'est différenciée normalement alors qu'elle ne s'est pas segmentée chez un embryon opéré au stade de 15 paires de somites et l'inverse se présente aussi. Par contre, dans cette série, l'arrêt de la formation des somites se produit toujours lorsque les lames segmentaires isolées sont distendues à la fin de l'expérience et dans tous les cas séparées des derniers somites.

Dans le second type d'expérience la lame segmentaire isolée donne constam-

ment 3 ou 4 somites de taille normale suivis de 3 ou 4 somites de taille réduite. Plus en arrière, au niveau où les organes axiaux sont conservés, les somites se forment normalement.

Ces expériences confirment donc les résultats obtenus par Gallera, à savoir que l'ébauche somitique, considérée dans son ensemble, paraît déterminée. Cependant la formation des somites peut être inhibée.

Pour expliquer cette inhibition on peut évoquer trois causes apparentes – le traumatisme dû à l'incision, la distension de la lame segmentaire, le fait que la lame segmentaire se trouve isolée à la fois des organes axiaux et des somites différenciés.

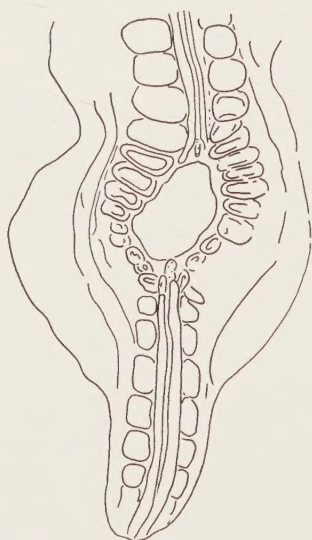


Fig. 1



A



B

Fig. 2

Fig. 1. Résultat de l'exérèse du tube neural et de la corde. Embryon opéré au stade 21 somites et incubé 18 h supplémentaires.

Fig. 2. Isolement de la lame segmentaire, du tube neural, de la corde et des somites différenciés ou en voie de l'être: A, séparation des somites par une incision transverse; B, excision de matériel présomitique. En noir, le trou provoqué par l'incision; en pointillé, la région de la lame segmentaire qui a été excisée; en hachures, le tube neural.

Des expériences témoins permettent d'éliminer la première des causes supposées: si l'incision est pratiquée entre la lame segmentaire et les lames latérales, les somites se forment normalement dans tous les cas (12 cas). D'autres expériences relatives plus loin conduisent à la même conclusion.

B. Etat de détermination du matériel présomitique à différents niveaux des lames segmentaires

Pour isoler le matériel présomitique, l'embryon est fissuré, comme précédemment, le long du tube neural; de plus, le blastoderme est coupé perpendiculairement à l'axe embryonnaire, en arrière des derniers somites et ceci à divers niveaux. En outre, pour empêcher une réparation trop rapide des lésions, j'ai enlevé les deux derniers somites, ou bien le dernier somite avec une fraction déterminée de la lame segmentaire (Fig. 2). Outre que ce procédé garantit la séparation des somites d'avec la lame segmentaire, il a l'avantage d'empêcher la distension de cette dernière, à condition de pousser assez loin l'incision transverse.

Les premières expériences de ce type ont été faites après une légère coloration des embryons au rouge neutre (Fig. 8B-D). Cette méthode ne permet pas de reconnaître en toute rigueur le dernier somite formé. D'autre part, des embryons, colorés de la même manière, montraient après quelques heures des signes évidents d'intoxication, raison pour laquelle ils n'ont pas été retenus. C'est pourquoi les résultats ont été contrôlés en opérant des embryons préparés selon la technique de Sandor décrite plus haut qui n'offre pas ces inconvénients (Fig. 8E). Les résultats sont donnés dans le Tableau 2.

Tableau 2. *Evolution de la lame segmentaire après l'opération*

	Lame segmentaire complète	Lame segmentaire moins la valeur de 1,5 somite	Lame segmentaire moins la valeur de 2 ou 3 somites	
	Embryons opérés après coloration au rouge neutre		Embryons opérés après injection de gélose saline au noir animal	
Nombre total d'embryons opérés	30	19	14 (4 moins 2 somites, 10 moins 3 somites)	8 (moins 3 somites)
Segmentation normale du côté opéré	22 (74 %)	7 (37 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Segmentation incomplète du côté opéré	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (15 %)	8 (100 %)
Absence totale de segmentation du côté opéré	8 (26 %)	12 (63 %)	12 (85 %)	0 (0 %)

Du côté témoin les somites se sont formés normalement chez les embryons retenus. Du côté opéré, la région isolée de la lame segmentaire a formé autant de somites (5 à 6) que la région correspondante du côté témoin lorsque la

longueur de la partie excisée était inférieure à la valeur de deux somites ou n'en a pas formé du tout suivant les cas. Les embryons de ces séries (1ère et 2ème colonnes) ont été fixés 5 à 7 h après l'opération.

Lorsque la valeur de deux ou trois somites est supprimée, la lame segmentaire ne forme au mieux que 3 ou 4 somites (ligne 3), alors que du côté témoin il en apparaît au moins 10, l'incubation après l'opération ayant duré plus de 12 h.

L'excision d'une partie crâniale de la lame segmentaire a donc empêché ou inhibé la formation de nouveaux somites. Dans certains cas, le simple isolement d'avec les somites différenciés aboutit au même résultat, mais cette séparation paraît être moins efficace que l'ablation de l'apex de la lame segmentaire. Par ailleurs, bien que l'on constate une inhibition dans le cas des embryons préparés selon la technique de Sandor, les résultats sont plus nets lorsque les embryons ont été colorés au rouge neutre. Il est probable que la coloration exerce aussi une action inhibitrice. Mais en dépit de cette inhibition, on ne peut empêcher une certaine différenciation de type somitique. Même dans les cas où il n'y a pas eu de métamérisation, le mésenchyme s'est tout de même condensé à l'avant de la lame segmentaire quelques heures après l'opération (4 à 6 h; Fig. 8C). Par la suite un myocoele et un épithélium équivalent au dermatome peuvent apparaître dans une telle structure. Seule la segmentation fait défaut.

Ainsi l'isolement d'avec l'axe embryonnaire et d'avec les somites différenciés ou en cours de différenciation, retentit sur l'évolution du blastème somitique.

II. *Etude du pouvoir de régulation du matériel présomitique*

Toute ébauche qui n'a pas acquis sa détermination est capable de régulation. Comment la chose se présente-t-elle pour l'ébauche d'un somite?

Est-il possible d'obtenir une seule rangée de somites en associant deux lames segmentaires? La suppression d'une partie de la lame segmentaire peut-elle être compensée? Est-il possible d'obtenir la formation de somites complets après fissuration de l'ébauche d'un somite particulier?

A. *Régulation des excédents*

Lorsqu'un segment de tube neural est enlevé au niveau des lames segmentaires et pourvu que l'endoderme ne se déchire pas, celles-ci se soudent dans le plan médian de l'embryon. Il ne se forme qu'une seule rangée de somites. Selon les modalités de l'expérience, les premiers somites formés au niveau de l'exérèse sont doubles ou uniques. Ils sont doubles lorsque la lésion s'étend en avant jusqu'au niveau des derniers somites formés au moment de l'opération (6 cas) (Fig. 3B); ils sont simples lorsque la lésion intéresse un tronçon de tube neural placé plus en arrière à une distance équivalant à 2 ou 3 somites (3 cas) (Fig. 3A).

On peut en conclure qu'aux stades étudiés, la 'latéralité' du matériel somitique

n'est pas encore fixée, si ce n'est à l'avant des lames segmentaires. Autrement dit, les somites ne sont réellement déterminés que dans la région apicale des lames segmentaires.

B. Régulation des déficiences

(1) *Expériences de section longitudinale.* Le but de ces expériences était de vérifier en premier lieu le pouvoir de régulation de la lame segmentaire, en second lieu de voir dans quelle mesure les structures voisines des lames segmen-

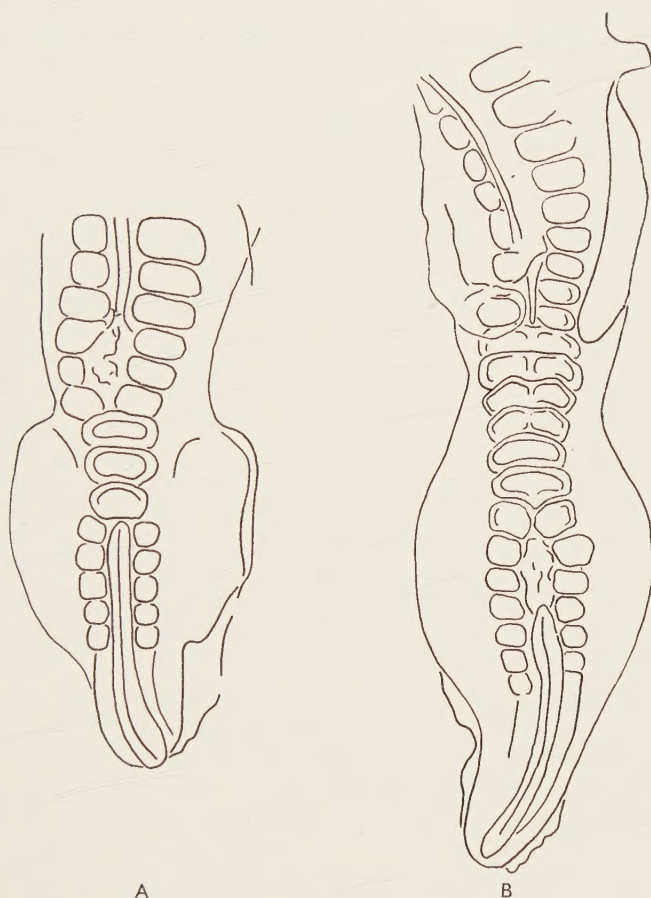


Fig. 3. Régulation des excédents à la suite de l'ablation d'un tronçon de tube neural.

(A) Embryon opéré au stade 22 paires de somites. Les lames segmentaires se sont réunies à partir du 26ème somite. Dès ce niveau, les lames segmentaires forment une seule rangée de somites dont la structure est simple. Ces somites ne montrent qu'un myocèle et qu'un dermatome.

(B) Embryon opéré au stade 18 somites. Les lames segmentaires se sont réunies à partir du 21ème somite. Jusqu'au niveau du 24ème inclus la structure des somites médians est double. On y reconnaît deux myocèles et, sur les coupes histologiques, deux dermatomes. Seuls les somites 25 et 26 ont une structure simple.

Dessins à la chambre claire.

taires, en particulier les somites différenciés, pouvaient influencer le matériel présomitique.

Dans une première série, la lame segmentaire droite a été fendue selon sa longueur et séparée des derniers somites par une incision transverse (Fig. 4A, B). Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.

La demi-lame interne a toujours formé le même nombre de somites que la lame segmentaire témoin. La demi-lame externe ne s'est pas segmentée ou a formé moins de somites.

Tableau 3. *Régulation des déficiences dans les lames segmentaires séparées des somites*

Nombre total ...	Embryons opérés après coloration au rouge neutre 18			Embryons opérés après injection de gélose saline au noir animal 6		
	Segmenta- tion normale	Retard	Non segmentés	Segmenta- tion normale	Retard	Non segmentés
Lame segmen- taire témoin	18	0	0	6	0	0
Demi-lame interne	18	0	0	6	0	0
Demi-lame externe	0	4	14	0	4	2

Tableau 4. *Régulation des déficiences dans les lames segmentaires associées aux somites*

Nombre total ...	Embryons opérés après coloration au rouge neutre 8			Embryons opérés après injection de gélose saline au noir animal 7		
	Segmenta- tion normale	Retard	Non segmentés	Segmenta- tion normale	Retard	Non segmentés
Lame segmen- taire témoin	8	0	0	7	0	0
Demi-lame interne	7*	0	0	6	1†	0
Demi-lame externe	5	0	3	6	1†	0

* Un embryon a formé plus de somites dans la demi-lame interne que du côté témoin et que dans la demi-lame externe.

† Il s'agit du même embryon, la demi-lame interne a formé plus de somites que la demi-lame externe mais moins que la lame témoin.

Encore une fois, il semble que la coloration par le rouge neutre gêne la différenciation des somites.

Dans la seconde série, la lame segmentaire droite a été fendue de la même

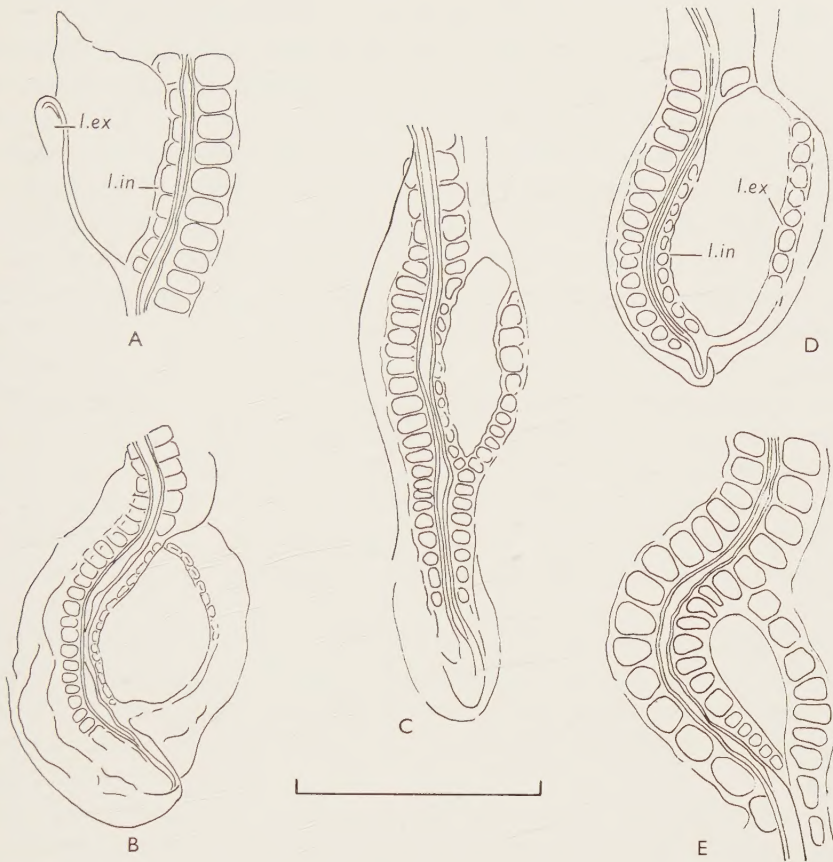


Fig. 4. (A, B) Régulation des déficiences dans les lames segmentaires séparées des somites.

(A) Embryon opéré au stade 20 paires de somites et coloré préalablement au rouge neutre, incubé 17 h supplémentaires. *l.ex*, demi-lame externe; *l.in*, demi-lame interne.

(B) Embryon opéré au stade 10 paires de somites après injection de gélose saline au noir animal, incubé 18 h supplémentaires. Régulation, mais dans la demi-lame externe, la segmentation est retardée.

(C, D, E) Régulation des déficiences dans les lames segmentaires associés aux somites.

(C) Embryon opéré au stade 18 somites. Trois somites entiers (plus une fraction d'un 4ème) ont été laissés à l'avant de la demi-lame externe. Les deux moitiés de l'ébauche somitique ont formé le même nombre de somites. Coloré au rouge neutre.

(D) Embryon opéré au stade 16 somites. Trois somites ont été laissés en avant de la demi-lame externe. Dans cette partie de l'ébauche somitique, la segmentation est en retard. Injection de gélose au noir animal.

(E) Embryon opéré au stade 11 paires de somites. Les 2 somites séparés de l'axe se sont secondairement remis en place. La demi-lame interne a formé plus de somites que du côté témoin. Coloré au rouge neutre.

Dessins à la chambre claire. Le trait d'échelle représente 1 mm.

façon et les deux ou trois derniers somites ont été séparés de l'axe embryonnaire de manière à rester associés à la demi-lame externe (Fig. 4C-E).

Les résultats sont montrés dans le Tableau 4. On voit, par comparaison avec le tableau précédent, que la présence de somites différenciés favorise la segmentation de la demi-lame externe.

L'examen histologique des embryons permet de constater deux faits. En premier lieu, les somites qui se différencient à partir de la demi-lame interne le font à peu près normalement. Il y apparaît en effet un dermatome au contact de la bande d'ectoderme recouvrant les somites (ou parfois au contact du tissu neural) et un sclérotome au contact de la corde et du tube neural. Le myotome est également bien développé; par contre la myocœle est souvent peu dilatée.

En second lieu, la différenciation des somites qui peuvent se former dans la demi-lame externe est moins complète. En général la segmentation, bien visible à l'examen macroscopique, est très difficile à saisir sur les coupes histologiques.

Tableau 5. *Expériences de délétion*

	Nombre	Cicatrisation sans remplace- ment du matériel excisé	Remplacement partiel du matériel excisé sans formation de somites	Somites normaux	Somites de taille réduite
Délétion à l'avant de la lame seg- mentaire	10	8	2	0	0
Délétion dans la région moyenne de la lame seg- mentaire	9	3	0	3*	3

* Dans un cas l'excision intéressait les 3 feuillet.

(2) *Expériences de délétion.* Ces expériences ont consisté à enlever un court fragment de lame segmentaire, dont la longueur équivalait à celle de 3 somites, soit immédiatement en arrière du dernier somite, soit plus en arrière à une distance correspondant à la longueur de 3 somites. L'endoderme a le plus souvent été respecté. Le Tableau 5 résume les résultats.

Il est possible dans ces deux séries d'expériences que les réparations partielles soient dues à une exérèse insuffisante du matériel présomitique, bien que cela n'ait pas été constaté après l'opération. Il n'en reste pas moins qu'une régulation est possible lorsque l'ablation est faite en arrière de l'apex de la lame segmentaire. Quand c'est la partie apicale qui est supprimée, il n'y a pas de régulation.

(C) Régulation longitudinale

Si le matériel présomitique n'est pas déterminé, il doit être possible de modifier l'ordre d'apparition des somites. Dans ce but, de nombreuses expériences ont été tentées (plus de 150 cas).

Au total, 13 embryons ont pu être analysés. Chez deux d'entre eux, le sens dans lequel la segmentation progresse a été modifié après retournement de la lame segmentaire.

Dans un premier temps, j'ai transplanté du matériel de la région postérieure des lames segmentaires, ou de la ligne primitive, dans la région antérieure des lames segmentaires chez des embryons de 24 h. Les embryons utilisables, au nombre de 4, n'ont reçu que des implants provenant de la région de la ligne primitive; dans aucun d'eux, il n'y a eu formation de somites à partir du greffon.

Chez les embryons plus âgés, les implants ne se sont pas incorporés aux structures de l'hôte. Pour cette raison, j'ai tenté de retourner la lame segmentaire dans sa totalité avec l'ectoderme qui la recouvre, l'endoderme restant en place; l'opération a été tentée dans l'œuf à divers stades. Chez les embryons de 24 h, une partie du matériel de la ligne primitive a été retournée en même temps que la lame segmentaire.

Chez l'un (Fig. 8F), opéré au stade 4 somites, le greffon qui comprenait un fragment de ligne primitive long de 0,5 mm, s'est segmenté dans le sens inverse de sa polarité d'origine. La partie originellement crâniale n'était pas encore segmentée au moment de la fixation. Les somites se sont formés au même niveau que du côté non opéré.

Chez l'autre (Fig. 8G), opéré au stade 7 somites, le fragment retourné comprenait toute la lame segmentaire (sauf la région apicale dont 0,1 mm environ a été laissé en place) et un court tronçon (0,1 mm) de matériel situé en arrière du bulbe cordal. Ce matériel s'est segmenté, mais les premiers somites formés dans la bandelette retournée sont d'allure anormales. Comme dans le cas précédent, la région qui était crâniale à l'origine n'est pas encore segmentée.

Dans les autres cas, les embryons ont été fixés trop tôt (3 cas), ou bien trop tard de sorte que tout le greffon avait formé des somites. Dans ce cas l'ordre d'apparition des somites ne peut être constaté. Cependant, à en juger par leur taille relative, il n'y a pas eu régulation. Les somites provenant de la région précédemment crâniale sont plus grands que ceux qui se trouvent devant eux.

On peut conclure de ces expériences que jusqu'au stade 7 somites, la régulation de la polarité crânio-caudale est possible.

III. Les effets des structures voisines des lames segmentaires sur la formation des somites

Les expériences d'ablation et d'isolement précédemment décrites devaient être contrôlées par d'autres expériences dans lesquelles la lame segmentaire serait associée à l'une ou l'autre des structures voisines.

Dans des essais préliminaires portant chacun sur environ 50 cas, les lames segmentaires ont été cultivées *in vitro* selon diverses modalités, soit seules, soit réassociées à une bande de tissu neural ou à un fragment de corde.

La culture était effectuée soit sur le milieu de Wolff & Haffen (1952) (milieu standard ou milieu à base de jus d'embryons de 4 à 5 jours), soit sur divers milieux liquides à base d'albumine et de jus d'embryon.

En aucun cas la croissance des explants n'a été notable. De même, il ne s'est pas formé de nouveaux somites quelles qu'aient été les modalités de l'expérience. Cependant le mésenchyme somitique a pu parfois évoluer en précartilage en présence de corde.

Des greffes de fragments de tube neural, de corde ou de tube neural et de corde ont également été tentées dans l'espoir de modifier le taux de segmentation chez des embryons d'environ 15 paires de somites. Les greffons étaient implantés le long de la lame segmentaire, soit du côté axial, soit du côté distal. Dans ce cas encore les résultats ont été négatifs. Le rythme et le mode de formation des somites de l'hôte n'est pas modifié. Le greffon, quelle que soit sa qualité, son orientation ou le site d'implantation, ne semble pas influencer la différenciation de la lame segmentaire à laquelle il est associé. Encore une fois l'absence de résultat pouvait être due à la modalité expérimentale. Restait à examiner les possibilités d'une autre méthode qui consiste à séparer la lame segmentaire d'avec les structures voisines sauf une et à laisser évoluer l'embryon. C'est cette méthode qui s'est révélée efficace.

(A) *Influence du tissu neural*

Comme dans les expériences d'isolement, la lame segmentaire est séparée de l'axe et des somites, mais dans ce cas l'incision sagittale partage le tube neural en deux, de sorte que la lame segmentaire droite reste associée à la moitié correspondante du tube neural. La corde demeure associée à l'autre moitié du tube neural. Du côté droit, l'extrémité crâniale de la lame segmentaire est excisée sur une longueur de deux ou trois somites en même temps que le tronçon du demi tube neural qui lui correspond. Pour éviter une réparation trop importante et pour que la tension des deux lames segmentaires soit équivalente, une fente transverse est pratiquée en arrière des somites du côté témoin (Fig. 5A).

Chez 8 embryons opérés de cette façon, et dont le développement s'est poursuivi de manière satisfaisante, la lame segmentaire droite a formé des somites normaux. Ces somites se sont différenciés aux mêmes niveaux qu'à gauche. J'ajoute qu'on trouve dans quelques cas un somite raccourci à l'avant de la lame somitique. Le comptage des somites des deux côtés de l'embryon montre que ce somite là provient d'un reste de l'ébauche du dernier somite excisé. Puisque ce matériel ne s'est pas incorporé au somite suivant, il faut conclure qu'à ce niveau les somites sont déterminés. Autrement dit, au stade de l'opération (15 paires de somites), 2 somites au moins étaient déterminés à l'avant de la lame segmentaire.

(B) *Influence de la corde*

Le système nerveux ayant été excisé avec succès en arrière des somites chez 3 embryons, une déchirure s'est produite entre la corde et l'une des lames segmentaires. Dans les trois cas, la segmentation et la croissance furent normales dans la lame associée à la corde. L'autre lame a formé le même nombre de somites, mais les derniers étaient réduits en taille (Fig. 5B).

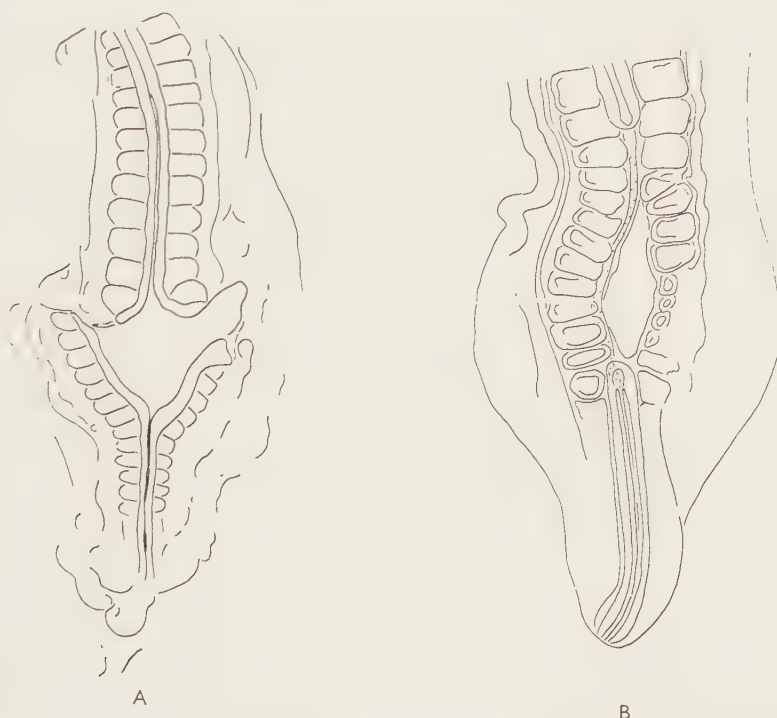


Fig. 5. (A) Association d'un demi-tube neural avec une lame segmentaire privée de son apex. Les somites se forment normalement des deux côtés de l'embryon. La lame segmentaire privée de son apex et associée au demi-tube neural est située à droite sur la figure.

(B) Différenciation des lames segmentaires en présence de corde après suppression du tube neural. Après l'opération l'endoderme s'est déchiré. La lame segmentaire gauche associée à la corde a formé des somites normaux. La lame segmentaire droite séparée de la corde a formé des somites plus petits (comparer à la Fig. 1).

Divers essais ont été faits pour supprimer à la fois le tube neural et la partie apicale des lames segmentaires. Le plus souvent, ce type d'opération entraîne des déchirures du blastoderme telles que les embryons dégénèrent. La méthode qui a donné des résultats est schématisée sur la Fig. 6; son principe consiste à conserver la moitié du tube neural, associé à la lame segmentaire complète, la corde restant associée à la lame incomplète.

Dans la zone de l'opération, le segment de corde apparaît alors proche du

mésoderme somitique mais nettement séparé de lui, la cohésion des deux éléments n'étant maintenue que par le lambeau d'endoderme. En général, les embryons supportent mal l'opération et, dans la moitié des cas, ne cicatrisent pas leurs lésions.

Au total, sur une trentaine d'embryons opérés, 5 ont évolué de façon satisfaisante et ont formé normalement des somites. Comme dans le cas de l'association de la lame segmentaire avec le tube neural, ces somites apparaissent normaux en nombre et en taille.

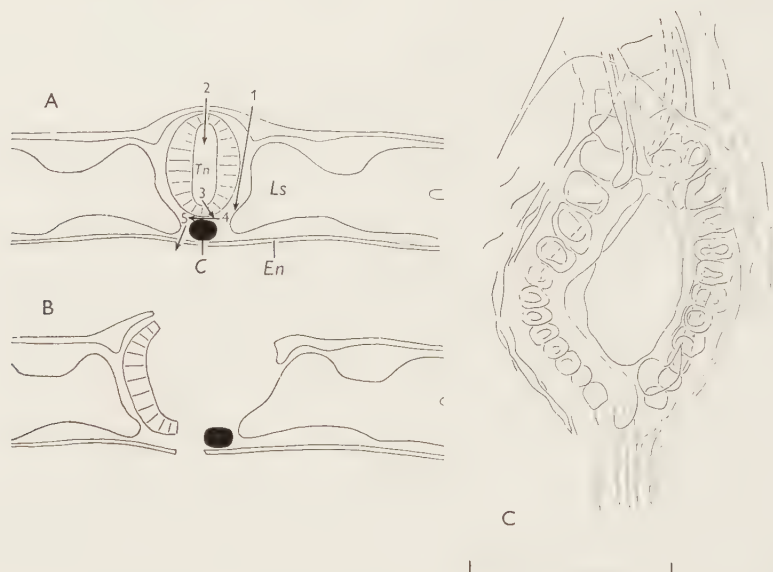


Fig. 6. (A, B) Schéma de l'opération qui consiste à laisser la lame segmentaire associée à la corde tout en supprimant le tissu neural. C, corde; En, endoderme; Ls, lame segmentaire; Th, tube neural; 1-5, les diverses sections qui sont pratiquées. En B, le résultat de l'opération.

(C) Evolution des embryons dont une lame segmentaire, privée de son apex, reste associée à un tronçon de corde. Dessin à la chambre claire. Le tronçon de corde est représenté en pointillé. Le premier somite formé (à droite) représente en réalité un demi-somite. Le trait d'échelle représente 1 mm.

Cependant, dans les 5 cas décrits, du tissu neural existe au contact de la corde et des nouveaux somites. Chez l'un d'eux la quantité en est faible (Fig. 7), mais elle est plus importante chez les quatre autres. D'où vient ce tissu neural ?

D'une part l'étude des embryons qui n'ont pu évoluer montre que l'opération ne laisse subsister que quelques traces de tissu neural. D'autre part la quantité de tissu neural présente dans les cas considérés est telle qu'il faut chercher une autre explication qu'une simple erreur opératoire. Aux stades utilisés, le tube neural ne répare pas les lésions telles que celle qui est pratiquée (Wenger, 1950; Strudel, 1953, 1955).

L'aspect histologique de la région opérée suggère que le bourrelet de cic-

trisation ectodermique pourrait être à l'origine de cette réparation. En effet, on retrouve la trace du bourrelet de cicatrisation ectodermique (Fig. 7) dans la masse de tissu neural néoformé, en particulier chez les embryons fixés précocement où le tissu est encore mal organisé. Chez les embryons plus âgés, on le trouve aussi à l'avant du fragment de corde. Dans le cas présent, il y a continuité parfait entre le bourrelet de cicatrisation et le tissu neural alors que d'ordinaire (Sengel & Thevenet, 1966) ce bourrelet reste tout à fait distinct du tissu neural préexistant. Une discontinuité s'établit seulement lorsque l'embryon a reconstitué un demi-tube neural. A ce stade le tissu en question est incontestablement neural.

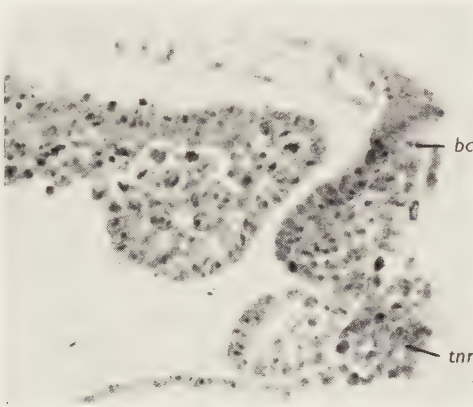


Fig. 7. Aspect histologique d'une lame segmentaire associée à la corde et dont l'apex a été supprimé. La coupe passe à l'avant de la lame segmentaire. Au contact de la corde se trouvent un petit résidu de tissu neural (*tnr*) et le bourrelet cicatriciel de l'ectoderme (*bc*) qui paraît hypertrophié.

(C) Influence des somites

On a vu que la lame segmentaire séparée de la corde et du tube neural forme encore des somites si elle reste en contact avec sa partie crâniale. Le matériel présomitique en cours d'organisation influence donc favorablement la formation de nouveaux somites derrière lui. Le matériel somitique différencié semble lui-même exercer une influence favorable sur la différenciation du mésoderme de la plaque somitique. Cependant, dans les cas où la corde et le tube neural restent solidaires des derniers somites, on peut penser que ceux-ci transmettent simplement au mésenchyme présomitique un facteur d'origine axiale. S'il existe une influence propre des somites différenciés, on doit pouvoir le vérifier en isolant en même temps la lame segmentaire et les deux derniers somites différenciés d'avec la corde et le tube neural.

Neuf embryons ont été opérées de la sorte. Ils ont évolué de façon satisfaisante. Les somites ont continué à se former dans la lame segmentaire. Chez ces embryons, l'évolution de l'ébauche somitique se fait de la même façon que

lorsque la plaque somitique est simplement séparée de la corde et du tube neural. On doit conclure que par eux-même, les somites favorisent la formation de nouveaux somites.



DISCUSSION

L'étude de la formation des somites s'appuie sur deux séries d'hypothèses: l'une envisage le rôle éventuel de certains territoires de l'embryon dans l'induction des somites, l'autre tente d'expliquer pourquoi il y a formation de métamères successifs.

La recherche des effets des ébauches voisines dans la différenciation du territoire somitique a donné lieu à toute une série de travaux. Tour à tour ont été mis en cause, le tissu neural (Grünwald, 1935; Fraser, 1960), deux centres différenciateurs (centres somitiques) situés de part et d'autre du nœud de Hensen (Spratt, 1955), le nœud de Hensen (Nicolet, 1968). Aucune de ces hypothèses n'apparaît pleinement explicative car la suppression de ces structures n'empêche

FIGURE 8

- (A) Embryon opéré *in vitro* au stade 12 paires de somites et cultivé 18 h supplémentaires: retard de la segmentation.
- (B, C) Résultats de l'isolement de la lame segmentaire d'avec le tube neural, la corde et les somites. Embryons opérés au stade 18 paires de somites et colorés préalablement au rouge neutre, 6 h après l'opération.
- C (B) Arrêt de la segmentation. Le mésenchyme se condense à l'avant de la lame segmentaire.
- B (C) L'incision transverse s'est réparée, cependant la segmentation n'a pas repris dans la lame segmentaire isolée.
- (D, E) Résultats de l'isolement d'une lame segmentaire privée de sa région apicale.
- (D) Embryon opéré au stade 15 paires de somites. L'apex de la lame segmentaire a été supprimé sur une longueur correspondant à 3 somites. Trois ou 4 somites se sont différenciés à l'avant de la lame segmentaire ils sont de taille décroissante. En arrière la lame segmentaire reste indivise jusqu'à l'endroit où elle rejoint l'axe embryonnaire. A ce niveau deux somites, de forme irrégulière mais de taille normale, se sont individualisés. *ls*, lame segmentaire indivise; *s*, somites. Coloration préalable au rouge neutre.
- (E) Embryon opéré de la même façon au stade 17 paires de somites. Il a formé 5 somites de taille décroissante; en arrière, la lame segmentaire de taille très réduite est indivise. Embryon photographié sans coloration en vue ventrale. Injection de gélose au noir animal.
- (F, G) Régulation après retournement de la lame segmentaire. Les flèches indiquent les limites de la région retournée.
- (F) Embryon opéré au stade 4 paires de somites.
- (G) Embryon opéré au stade 7 paires de somites.
- (H) Aspects histologiques d'un embryon dont une lame segmentaire a été isolée de l'axe et privée de son apex. Embryon opéré au stade 14 paires de somites et fixé 6 h 30 plus tard. La coupe passe au niveau du 17ème somite (côté témoin). Le côté témoin montre 19 somites. $\times 190$. *ec*, ectoderme; *en*, endoderme; *ms*, mésoderme somitique.
- (I) Aspect histologique d'une lame segmentaire isolée de l'axe et dont l'apex a été supprimé. Embryon opéré au stade 17 paires de somites et fixé 18 h plus tard. La coupe passe à l'avant de la lame segmentaire au niveau du 21ème somite. Formation d'un somite. Le blastème mésonephritique (*bn*) dégénère. $\times 190$.

pas la formation des somites. Cependant Nicolet a montré que le nœud de Hensen peut induire des somites à son contact dans une région non déterminée de la ligne primitive. Le nœud de Hensen partage cette propriété avec le mésenchyme présomitique voisin. Le tissu neural ne la possède pas. Ainsi s'expliquent les résultats de Bellairs (1963) qui constate que des somites apparaissent chaque fois que le mouvement de régression du nœud de Hensen ou de la région qui l'entoure s'effectue. En réalité, seul importe apparemment celui du nœud de Hensen; encore n'est-il qu'un facteur conditionnant (Nicolet, 1968). Le matériel somitique présomptif reçoit donc précocement une certaine détermination. Reste à savoir jusqu'où va cette détermination. Est-ce le caractère dorsal de l'ébauche ou déjà le pouvoir de se segmenter qui est déterminé? Dans cette dernière hypothèse, l'ébauche de chaque somite est-elle déjà déterminée?

En dehors des théories phylogénétiques, qui ne sont d'aucune utilité pour l'expérimentateur, seule l'hypothèse de Dalcq (1949), qui voit dans la métamérisation la conséquence d'une compétition physiologique, tente de rendre compte de l'aspect répétitif de la somitogenèse. Selon cette théorie la métamérie résulterait de l'utilisation par les cellules présomitiques d'une substance diffusible répartie en gradients. Cette substance, à partir d'un certain seuil de concentration provoquerait l'agrégation des cellules. Elle serait en même temps utilisée (fixée ou dégradée) par ces cellules de sorte que sa concentration deviendrait momentanément insuffisante pour permettre aux cellules du voisinage de se rassembler. Ainsi s'expliquerait la formation de groupes cellulaires distincts les uns des autres.

Cette hypothèse implique que la détermination d'un somite particulier est contemporaine de sa différenciation ou la précède de peu. Elle suppose en outre que les cellules présomitiques possèdent déjà toutes les propriétés nécessaires pour former un nodule épithélial, seul un facteur extrinsèque leur ferait défaut pour se différencier.

Autrement dit, la formation des somites résulterait d'une induction de type permissif.

Les résultats qui viennent d'être exposés confirment ceux de Gallera. L'ébauche somitique prise dans sa totalité peut s'autodifférencier. Elle est donc déterminée, au moins d'une façon globale.

Cependant l'état de détermination ne paraît pas être le même aux différents niveaux de la lame segmentaire. La région antérieure peut s'autodifférencier d'une manière normale. A ce niveau la position même des fissures intersomitiques est fixée.

Plus en arrière, le matériel présomitique est capable de s'autodifférencier dans certains cas. Mais la qualité de cette différenciation décroît rapidement vers l'arrière lorsque la lame segmentaire est isolée et privée de son apex; de plus l'autodifférenciation n'est pas la règle. Le caractère segmentaire du matériel présomitique n'est pas complètement déterminé à ce niveau. Il en résulte que l'ébauche d'un somite donné ne l'est pas non plus. C'est ce que prouvent les expériences de régulation qui confirment l'observation de Spratt et celles de

Menkes & Miclea (cf. Introduction). Au contraire la même région donne des somites correctement disposés lorsqu'on la laisse en association avec le tube neural ou la corde (l'action de la corde devra être vérifiée par des expériences d'un autre type).

Les organes axiaux semblent donc imposer la localisation des fissures intersomitiques.

Cependant, cette conclusion n'est vraie que pour une lame segmentaire complète dans le sens transverse. Elle n'est pas toujours vérifiée lorsque l'on considère une demi-lame segmentaire (Fig. 4D, E). (Ce fait donne à penser qu'un facteur quantitatif pourrait être en cause.)

On est finalement conduit à supposer qu'il existe, dans les organes axiaux, dans les derniers somites et dans la région apicale des lames segmentaires, un facteur responsable de la formation des somites. Ce facteur est vraisemblablement réparti selon un gradient crânio-caudal et sans doute aussi selon un gradient dorso-ventral. Sa concentration optimale sinon maximale est atteinte dans la région où se forment les somites. Plus en arrière sa concentration doit être insuffisante.

L'excision de fragments de tailles différentes à l'avant de la plaque somitique se traduit par une diminution de la fréquence avec laquelle les somites apparaissent à mesure que l'on prélève des fragments plus grands. D'autre part dans la lame segmentaire isolée de l'axe et privée de son apex les somites sont peu nombreux et les derniers apparus sont de taille réduite. Sans doute le facteur responsable de la différenciation des somites s'épuise-t-il lorsque la lame segmentaire est isolée. Cette constatation est favorable à l'hypothèse, formulée par Dalcq, d'une compétition physiologique entre les cellules présomitiques.

RESUME

Le déterminisme de la formation des somites a été analysé.

Une lame segmentaire complète, isolée à la fois de la corde, du tube neural et des somites, peut former de nouveaux somites. Elle en forme toujours lorsque, simplement séparée de la corde et du tube neural, elle reste en continuité avec les derniers somites.

Lorsque la lame segmentaire est à la fois isolée de l'axe et privée de sa partie apicale elle ne s'autodifférencie pas ou le fait de façon incomplète. Dans ce dernier cas la qualité de la différenciation décroît dans le sens céphalo-caudal.

Lorsque la lame segmentaire, séparée de son apex, reste en contact avec le tissu neural ou avec la corde, elle forme normalement des somites.

Dans tous les cas où la lame segmentaire est séparée à la fois du tube neural et de la corde, sa croissance est réduite.

En arrière de son apex la lame segmentaire peut réguler aussi bien les excédents que les déficiences.

Il apparaît donc que les fissures intersomitiques ne sont déterminées qu'à l'apex de lames segmentaires. Cette détermination s'établit progressivement de l'avant vers l'arrière.

Bien qu'elle puisse être transmise par les derniers somites différenciés et par l'apex de la lame segmentaire, elle vient surtout du tube neural, et peut-être de la corde, car c'est au contact de ces structures que chaque fissure intersomitique s'établit à son niveau normal.

Ce travail a été présenté pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences (Thèse n° A.O. 3911), Faculté des Sciences de Nancy, 1969.

TRAVAUX CITES

- BELLAIRS, R. (1963). The development of somites in the chick embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* **11**, 697-714.
- CHARRAULT, D. (1961). *La formation du squelette chez les embryons de Poulet traités au bleu trypan*. Diplôme d'études supérieures, Fac. Sci., Strasbourg.
- DALCO, A. (1949). The concept of physiological competition (Spiegelman) and the interpretation of vertebrate morphogenesis. (*Proc. 6th Int. Congr. exp. Cytol.*, 1947.) *Expl Cell Res.*, supp. 1, pp. 483-496.
- FRASER, R. (1960). Somite genesis in the chick. III. The role of induction. *J. exp. Zool.* **145**, 151-167.
- GALLERA, J. (1966). Le pouvoir inducteur de la corde et du mésoblaste parachordal chez les Oiseaux en fonction du facteur 'temps'. *Acta anat.* **63**, 388-397.
- GRÜNWARD, P. (1935). Teratologische Untersuchungen über die mutmasslichen Beziehungen der Abnormen und normalen Medularanlage zur Entwicklung der Urwirbel beim Hühne. *Arch. EntwMech.* **133**, 664-693.
- HERRMANN, H. (1953). Interference of amino-acid analogues with normal embryonic development. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 291-295.
- HERRMANN, H., KONIGSBERG, U. R. & CURRY, M. F. (1955). A comparison of the effects of antagonists of leucine and methionine on the chick embryo. *J. exp. Zool.* **128**, 359-377.
- MENKES, B. & MICLEA, C. (1962). Cercetari asupra formării organelor axiale. III. Posibilitățile de vindicare și reorganizare a mesodermului axial presomitic în urma disocierii mecanice. Formarea de somite supranumerare. *Studii Cerc. științ. Baza. Timișoara* (Seria științe medicale) **9**, 203-228.
- MULHERKAR, L. (1960). The effects of trypan blue on chick embryos cultured *in vitro*. *J. Embryol. exp. Morph.* **8**, 1-5.
- NICOLET, G. (1968). Le rôle du nœud de Hensen dans la différenciation des somites chez les Oiseaux. *Experientia* **24**, 263-264.
- ROTHFELS, U. (1954). The effects of some amino acid analogues on the development of the chick embryo *in vitro*. *J. exp. Zool.* **125**, 17-37.
- SANDOR, S. (1968). A new method for *in vivo* time-lapse cinematography of the chick embryo during the first three days of development. *Rev. roumaine Embryol. Cytol. (Série d'Embryologie)* **5**, 77-80.
- SENGEL, P. & THEVENET, A. (1966). Sur les modalités de la cicatrisation de l'ectoderme dorsal en la présence et en l'absence du tube neural chez l'embryon de Poulet. *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* **263**, 278-280.
- SPRATT, N. T. JR. (1955). Analysis of the organiser center in the early chick embryo. I. Localization of prospective notochord and somite cells. *J. exp. Zool.* **128**, 121-163.
- STÉPHAN, F. & SUTTER, B. (1960). Action du bleu trypan sur la différenciation du mésoderme axial chez l'embryon de Poulet. *C. r. Séanc. Soc. Biol., Paris* **154**, 1626-1628.
- STÉPHAN, F. & SUTTER, B. (1961). Réactions de l'embryon de Poulet au bleu trypan. *J. Embryol. exp. Morph.* **9**, 410-421.
- STRUDEL, G. (1953). Conséquences de l'excision de tronçons du tube nerveux sur la morphogénèse de l'embryon de Poulet et sur la différenciation de ses organes: contribution à la genèse de l'orthosympatique. *Annls Sci. nat. (Zool.)*, 11ème série, **15**, 251-329.
- STRUDEL, G. (1955). L'action morphogène du tube nerveux et de la corde sur la différenciation des vertèbres et des muscles vertébraux chez l'embryon de Poulet. *Archs Anat. microsc. Morph. exp.* **44**, 209-235.
- WENGER, E. L. (1950). An experimental analysis of relations between parts of the brachial spinal cord of the embryonic chick. *J. exp. Zool.* **114**, 51-86.
- WOLFF, ET. & HAFEN, K. (1952). Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Tex. Rep. Biol. Med.* **10**, 463-472.

(Manuscrit reçu le 14 septembre 1970)